ПАРАЗИТОЛОГИЯ, X, 3, 1976

УДК 576.895.121 : 576.8.095.18 : 597

ИЗУЧЕНИЕ КУМУЛЯЦИИ, ДЕСОРБЦИИ И МЕХАНИЗМА ДЕЙСТВИЯ ХЛОРОРГАНИЧЕСКИХ ЯДОХИМИКАТОВ НА ЦЕСТОДАХ РЫБ

**О. Н. Давыдов, И. И. Перевозченко, Л. П. Брагинский,
Я. Г. Бальон**

Институт зоологии и Институт гидробиологии АН УССР,
Киевский научно-исследовательский институт эндокринологии
и обмена веществ, Киев

Исследовано распределение остатков ДДТ и его метаболитов (ДДД и ДДЭ) в тканях *Triaenophorus nodulosus* и в его окончательном хозяине-щуке. Отмечено, что цестоды в значительных количествах накапливают хлорорганические препараты. В опытах установлена способность *Bothriocephalus gowkongensis* дехлорировать п,п′-ДДТ и выводить п,п′-, о, п′- и м, п′-ДДД из организма. Показано, что п,п′-ДДТ вызывает изменение биохимических показателей углеводного обмена цестод. Влияние п,п′-ДДТ на двигательную активность цестод носит двухфазный характер. Первая фаза связана с мышечным влиянием, вторая — нейротропным. Выявлена высокая токсичность м,п′-ДДД (0.1 мг/л) на двигательную активность цестод по сравнению с действием п,п′- н о,п′-ДДД.

Хлорорганические пестициды в связи с их повсеместным применением привлекают к себе все большее внимание как мощный экологический фактор в жизни вод, влияющий на снижение биологической продуктивности океанов, морей и внутренних водоемов. На основании экспериментальных исследований и многолетних наблюдений за жизнью водоемов в естественных условиях установлено, что применение хлорорганических ядохимикатов приводит к накоплению их в гидробионтах, в результате чего они гибнут или становятся источником отравления других животных (Muirhead-Thomson, 1971; Метелев и соавт., 1971; Брагинский, 1972; Cox, 1972; Morgan, Weinberg, 1972).

При изучении токсичности ядохимикатов для инвазированных гидробионтов нельзя недоучитывать влияния паразитарного фактора в пределах системы паразит—хозяин, поскольку паразиты, находящиеся в органах и тканях хозяина, не безразличны к действию токсикантов и должны реагировать на них. Сведений, касающихся влияния пестицидов на гельминтов, паразитирующих в организме рыб, в литературе практически нет.

Настоящая работа предпринята с целью изучения роли цестод в накоплении и десорбции некоторых хлорорганических препаратов и выяснения механизма их действия на паразитов.

Исследовали п,п′-ДДТ [1,1,1-трихлор-2,2-бис/п-хлорфенил/этан], п,п′-ДДД [1,1-дихлор-2,2-бис-/п-хлорфенил/-этан] и его о,п′- и м,п′-изомеры.

Несмотря на то что в настоящее время подчеркивается важность проблемы заменителей ДДТ, в частности несимметричных аналогов метоксихлора, разрушающихся в организме, и других и несмотря на то что поставлен вопрос об ограничении применения персистентных хлорорганических препаратов и снятии ДДТ с производства, проведение оценки токсичности дихлордифенилтрихлорэтана и его метаболитов не теряет своей актуальности, так как накопление и циркуляция таких препаратов, как ДДТ и его продуктов биодеградации, в условиях водной среды и проблема их «носительства» неизбежны в течение еще многих лет (Меткаф и соавт., 1972; Мельников, 1973).

Следует отметить, что п,п′- и о,п′-ДДД циркулируют в водных экологических системах как в результате применения технического препарата ДДД в качестве ларвицида для уничтожения личинок гнуса (Врочинский, 1970), так и потому, что п,п′-ДДД и его о,п′-изомер частично присутствуют в технических препаратах ДДТ, а частично образуются в биосубстратах в результате восстановительного дехлорирования из п,п′- и о, п′-ДДТ, содержание которых в техническом препарате ДДТ составляет до 75 и 20% соответственно (Мельников, 1968а). С точки зрения медицинской практики, интерес к техническому ДДД, а особенно к химически чистому о,п′-изомеру ДДД, обусловлен тем, что эти препараты используют в клинике при лечении некоторых глистных инвазий (Chanco et al., 1972) и заболеваний, связанных с гиперфункцией коры надпочечников (Комиссаренко и соавт., 1970).

м,п′-ДДД изучали в аспекте сравнительных исследований как вещество близкой химической структуры к вышеуказанным. п,п′-ДДЭ [1,1-дихлор-2,2-бис-/п-хлорфенил/-этилен] использовали только как «свидетель» в химико-аналитическом анализе при выяснении характера метаболизма п,п′-ДДТ в цестодах и рыбах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

В химико-аналитических, биохимических и физиологических исследованиях использовали живых половозрелых цестод: *Triaenophorus nodulosus* из кишечника щуки в возрасте 3—6 лет и *Bothriocephalus gowkongensis* из кишечника сеголетков и годовиков карпа. Щук отлавливали в Киевском водохранилище в весенне-летний период 1973 г., карпов — в прудах опытного хозяйства «Нивка» УкрНИИРХ. Карпов выдерживали в аквариумах с соблюдением необходимого температурного и кислородного режимов, цестод — в конических колбах в нормальном растворе Рингера (НР) в присутствии ядохимикатов или без них. Ежедневно проводили смену испытуемого и контрольного растворов. Химически чистые изомеры п,п′- о,п′- и м п′-ДДТ синтезировали конденсацией хлорбензола с соответствующими хлорфенилдихлоркарбинолами в присутствии серной кислоты (Бальон, Шульман, 1970). п,п′-ДДТ (т. пл. 109°) получали трехкратной кристаллизацией из технического препарата. Амилолитическую активность характеризовали микроэкспресс методом, предложенным Покровским и Щербаковой (цит. по: Асатиани, 1969), при 20° по скорости гидролиза крахмала раствором, содержащим гельминт, и выражали в единицах активности (ед.) — мг крахмала, гидролизуемого 1 г влажной ткани в 1 мин. Гликоген в тканях гельминтов определяли антроновым методом Пфлюгера в модификации Головацкого (1961). При пересчете глюкозы в гликоген применен коэффициент 0.91. Методические приемы по установлению содержания хлорорганических остатков и регистрации двигательной активности у цестод были такими же, как и в предыдущих сообщениях (Давыдов, 1972; Перевозченко, Давыдов, 1974). Содержание гликогена и хлорорганических остатков рассчитывали на 1 г влажной ткани гельминта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный химический анализ тканей щук, выловленных в Киевском водохранилище, показал, что висцеральный жир, печень и гонады содержат ДДТ и его метаболиты (см. таблицу). Значительные количества хлорорганических пестицидов накапливаются и в цестодах, паразитирующих в кишечнике щук. Суммарное содержание ДДТ и метаболитов в цестодах близко к их уровню в печени хозяина (0.83 и 1.0 мкг/г ткани).

Содержание ДДТ и его метаболитов в тканях щук и их цестодах (в мкк/г)*

Объект	Пестициды						
	ДДТ		ДДД		ДДЭ		ДДТ + + ДДД + + ДДЭ
	среднее	отклонения	среднее	отклонения	среднее	отклонения	среднее
Щука							
Гонады	0.03	0—0.1	0.05	0.01—0.1	0.04	0—0.1	0.12
Печень	0.26	0.1—0.5	0.35	0.15—0.63	0.4	0.15—0.85	1.01
Висцеральный жир	0.76	0.55—1.0	0.89	0.3—1.5	1.37	0.6—2.0	3.02
Цестода							
Триенофорус . .	0.11	0.02—0.55	0.65	0.03—1.6	0.07	0.05—0.1	0.83

* Средние величины в таблице выведены на основании анализа семи экземпляров инвазированных щук, выловленных в Киевском водохранилище.

Такая накопительная способность для гельминтов не случайна. Паразиты богаты липидами (Высоцкая, Сидоров, 1973) и, следовательно, должны обладать высоким сродством к лиофобному токсиканту. Метаболиты находили в исследуемых объектах в большем количестве, чем ДДТ. В цестодах их содержание преобладало над ДДТ в 6 раз, в гонадах, печени, висцеральном жире рыб -- в 3 раза. В висцеральном жире содержание ДДЭ было, как правило, выше, чем ДДД, в цестодах преимущественно кумулирован ДДД, в гонадах и печени содержание ДДД и ДДЭ варьировало примерно в равных пределах. В мышечной ткани и цельной крови щук ДДТ и метаболиты не обнаружены.

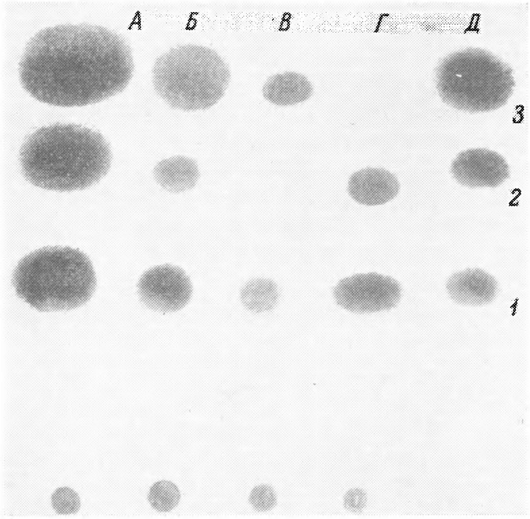

Рис. 1. Тонкослойная хроматограмма экстрактов ДДТ и его метаболитов из тканей щуки триенофоруса.

А — висцеральный жир; *Б* — печень; *В* — гонады (икра); *Г* — триенофорус; *Д* — свидетели: 2 мкг п,п′-ДДД (*1*), 4 мкг п,п′-ДДТ (*2*), 6 мкг п,п′-ДДЭ (*3*). На рис. 1 и 2 нижний ряд — линия старта.

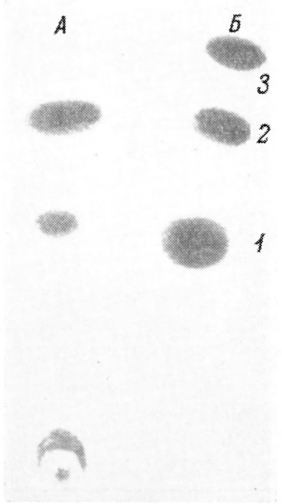

Рис. 2. Тонкослойная хроматограмма экстрактов п,п′-ДДТ и его метаболитов из тканей ботриоцефалюсов, инкубированных в течение пяти суток в растворе нормального Рингера при концентрации п,п′-ДДТ 0.1 мг/л.

А — экстракт гомогената ткани цестоды ботриоцефалюс; *Б* — свидетели: 2 мкг п,п′-ДДД (*1*), 1 мкг п,п′-ДДТ (*2*), 1 мкг п,п′-ДДЭ (*3*).

Как пример распределения ДДТ и его метаболитов в биоматериале на рис. 1 приведена тонкослойная хроматограмма экстрактов проб висцерального жира (навеска 10 г). печени. икры (навески по 20 г) и ткани паразита (навеска 3.3 г) для одной из инвазированных щук.

Способность цестод накапливать ДДТ и его метаболиты (ДДД и ДДЭ) проявлялась и в эксперименте на годовиках карпа, не содержащих «тканевого фона».

Возникает вопрос, могут ли ботриоцефалюсы разрушать ДДТ, а не только «пассивно» кумулировать метаболиты ДДТ в организме хозяина? Для ответа на него был поставлен эксперимент с инкубацией ботриоцефалюсов в растворах НР, содержащих п,п'-ДДТ в концетрациях 0.1 и 1.0 мг/л. Оказалось, что за сутки цестоды превращали в ДДД примерно 0.1 часть накопленного количества ДДТ. ДДЭ в гельминтах методом тонкослойной хроматографии обнаружен не был даже на 5-й день эксперимента (рис. 2), что свидетельствует об отсутствии или очень медленном протекании процесса дегидрохлорирования ДДТ в цестодах (ДДЭ улавливался только высокочувствительным методом газовой хроматографии).

Учитывая отмеченную выше способность цестод быстро превращать ДДТ в ДДД, мы решили проследить за накоплением и выведением химически чистых изомеров ДДД из организма ботриоцефалюсов. Образование ДДД в тканях цестод представляет значительный интерес еще и потому, что ДДД в 10—12 раз менее токсичен, чем ДДТ, и легче разлагается (Медведь и соавт., 1968; Мельников, 1968б).

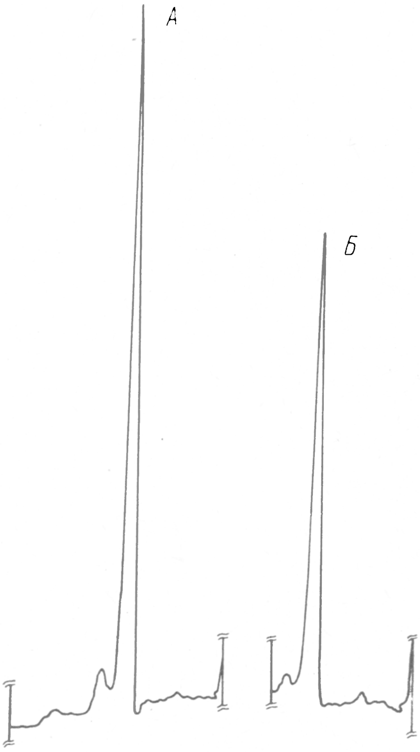

Рис. 3. Газовая хроматограмма экстрактов ткани цестоды ботриоцефалюс на 3-й день их контакта с о,п′-ДДД (0.1 мг/л) (*А*) и после 16-суточного выдерживания в растворе НР (*Б*).

Данные о накоплении изомеров ДДД в опытах in vivo были сообщены ранее (Перевозченко, Давыдов, 1974). поэтому в настоящей работе приводятся только результаты, полученные на ботриоцефалюсах, подвергавшихся действию изомеров ДДД in vitro. Обнаружено, что накопление препаратов у гельминтов протекает интенсивно. Так, например, 3-суточная инкубация при 19—20° в растворах, содержащих п,п'-, о,п'- и м,п′-ДДД в концентрации 0.1 мг/л, сопровождалась накоплением в тканях цестоды 106—120, 92—104, 112—137 мкг/г соответствующего препарата. В течение первых трех суток выведения ядохимикатов из тканей цестод не отмечено. На 8-е и 16-е сутки их убыль составляла 18, 18, 9 и 48, 63, 37% соответственно от исходного содержания п,п′-, о,п-′ или м,п′-ДДД. Для о,п′-изомера ДДД данные тонкослойной хроматографии подтверждены и газохроматографическим анализом (рис. 3).

Хроматографирование проведено на хроматографе «Цвет 106» со стеклянной колонкой, заполненной хромотоном с 15%-м SE-30. В анализ взяты равные аликвотные части экстрактов, соответствующие одинаковой навеске ткани паразита.

Опыты показали, что цестоды обладают высокой чувствительностью к ДДТ и отвечают на его действие усилением двигательных реакций. В экспериментах на фрагментах ботриоцефалюса, помещенных в раствор

НР с ДДТ, его действие четко проявляется при концентрации 1 мг/л. Через 5—6 мин. после начала действия препарата у ботриоцефалюсов происходит усиление частоты и амплитуды сокращений, что, по-видимому, указывает на быстрое проникновение его в ткань. Отмывание НР сопровождалось быстрым восстановлением первоначальной сократительной активности (рис. 4, *а*). В то же время после предварительного воздействия серотонина в концентрации 100 мг/л реакция на ДДТ у гельминтов отсутствовала, что позволяет говорить о его мышечном влиянии (рис. 4, *б*). Полученный факт согласуется с данными Александрюк (1965), которая установила, что серотонин действует на мышцы гельминта. вызывая резкое уменьшение вязкости протоплазмы и угнетение двигательных реакций.

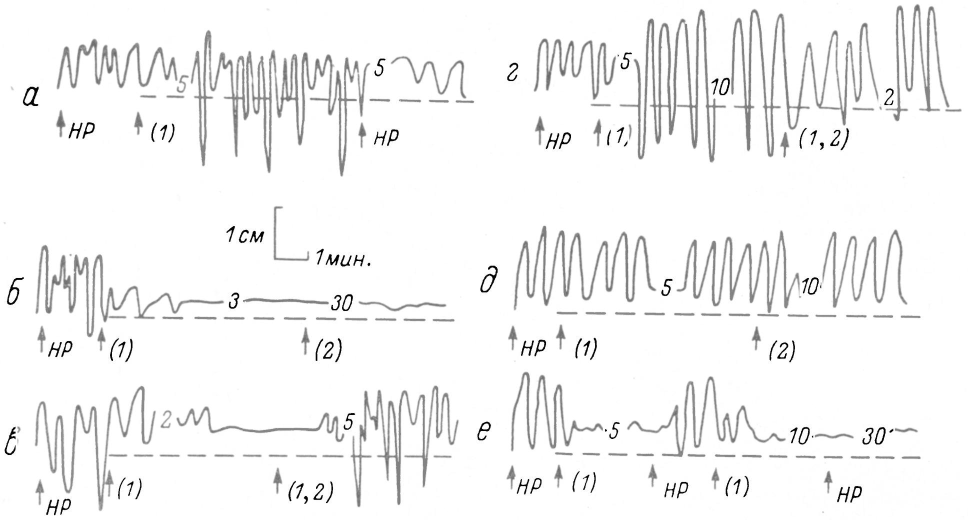

Рис. 4. Влияние п,п′-ДДТ, п,п′-ДДД и его о,п′- и м,п′-изомеров на двигательную активность цестод ботриоцефалюсов.

а — повышение частоты амплитуды сокращений при воздействии ДДТ (1 мг/л) (*1*); *б* — отсутствие реакций на ДДТ (1 мг/л) (*2*) после предварительного воздействия серотонина (100 мг/л) (*1*); *в* — восстановление ритмики при воздействии атропина (10 мг/л) и ДДТ (1 мг/л) (*1*, *2*) после предварительного применения атропина (10 мг/л) (*1*); *г* — уменьшение ритмики при воздействии ДДТ (1 мг/л) и атропина (10 мг/л) (*1*, *2*) после предварительного применения ДДТ (1 мг/л) (*1*); *д* — отсутствие реакции на о,п′-ДДД (0.1 мг/л) (*1*) и 10 мг/л (*2*); *е* — прекращение ритмики при воздействии м,п′-ДДД (0.1 мг/л) (*1*). *Стрелки* — действие исследуемых растворов, *цифры* в промежутке миограмм — остановка регистрации.

В дальнейших опытах было показано, что действие ДДТ на сократительную активность цестод носит нейротропный характер. На фоне спонтанной ритмики фрагмента атропин в концентрации 10 мг/л вызывал временное повышение тонуса и уменьшение амплитуды сокращений; затем наблюдалось угнетение двигательной активности. Такой атропинизированный фрагмент гельминта реагировал на ДДТ появлением ритмики, сходной с нормой (рис. 4, *в*). В то же время после предварительного воздействия ДДТ одновременное применение атропина и ДДТ приводит к уменьшению сократительной активности (рис. 4, *г*).

Таким образом, в действии ДДТ на цестод рыб можно различить две фазы. Первая из них связана с непосредственным влиянием его на мышцу: она проявляется в усилении двигательной активности при концентрации препарата 1 мг/л. Вторая фаза действия ДДТ связана с возбуждением М-холинореактивных систем гельминта.

Влияние ДДТ на цестод проявлялось не только в изменении их двигательной активности, но и сказывалось на показателях углеводного обмена. Увеличение частоты и амплитуды сокращения гельминтов под воздействием препарата сопровождалось снижением содержания гликогена. После 12 часов инкубации ботриоцефалюсов в растворе п,п′-ДДТ (1 мг/л) количество гликогена в тканях цестод составляло 2103±180 мкг при 6180±240 мкг в контроле. Амилолитическая активность паразитов при тех же условиях опыта возросла в 2—2.5 раза (0.255±0.045 ед., в контроле 0.114±0.012 ед.).

В физиологических опытах исследовалось также действие п,п′-ДДД и его о,п′- и м,п′-изомеров на двигательную активность ботриоцефалюсов. В концентрациях 0.1, 1.0 и 10.0 мг/л о, п′- и п,п′-ДДД не вызывали значительных изменений в сократительной активности гельминтов (рис. 4, *д*). В отличие от двух вышеуказанных изомеров м,п′-ДДД уже в концентрации 0.1 мг/л оказывал резкое угнетающее действие на мышечную активность цестод (рис. 4. *е*). После действия этой концентрации через 1—2 мин. наблюдалось прекращение всех двигательных реакций гельминтов. Восстановление ритмики происходило только в случае кратковременного воздействия препарата (в среднем 5—6 мин.). Если действие м,п′-ДДД было более длительно, то ни в одном из опытов не наблюдалось восстановление активности фрагментов.

Высокая токсичность м,п′-ДДД по сравнению с п,п′- и о,п′-ДДД, выявленная в физиологических опытах на изолированном фрагменте мышцы цестоды, по-видимому, связана с более быстрым проникновением токсиканта в ткань и его лучшей растворимостью в липидах (Nichols, 1961).

Таким образом, результаты проведенных исследований позволяют предполагать, что способность цестод накапливать, дехлорировать и в значительной степени выводить ДДД из организма по-разному может отражаться на процессе острого и хронического отравления гидробионтов. С одной стороны, гельминт «помогает» хозяину разрушать токсикант, с другой, накапливая ДДТ и его метаболиты, становится потенциальным источником вторичной интоксикации, так как процесс перераспределения ядохимиката между хозяином и цестодой. вероятнее всего. взаимосвязан и обратим.

ВЫВОДЫ

1. Исследовано распределение остатков ДДТ и его метаболитов (ДДД и ДДЭ) в тканях триенофорусов и их хозяев-щук. Отмечено, что цестоды в значительных количествах накапливают хлорорганические препараты.

2. Инкубация ботриоцефалюсов в растворе п,п′-ДДТ, п,п′-ДДД и его о,п′- и м.п′-изомеров сопровождается быстрым их накоплением в тканях и частичным дехлорированием п,п′-ДДТ. При выдерживании цестод, содержащих ДДД, в растворе нормального Рингера происходит постепенная элиминация ядохимиката из ткани в среду.

3. Установлено, что п,п′-ДДТ снижает содержание гликогена и вызывает увеличение амилолитической активности у ботриоцефалюсов.

4. Влияние п,п′-ДДТ на двигательную активность ботриоцефалюсов носит двухфазный характер. Первая фаза связана с мышечным действием, вторая — нейтропным.

5. Выявлена высокая токсичность м,п′-ДДД (0.1 мг/л) на двигательную активность ботриоцефалюсов по сравнению с действием п,п′- и о,п′-ДДД.

Литература

Александрюк С. П. 1965. Роль серотонина в регуляции двигательной активности ленточного гельминта Ligula intestinalis. Тр. гельминтолог. лабор. АН СССР, 15 : 5—25.

Асатиани В. С. 1969. Ферментативные методы анализа. Изд. «Наука», М.: 455—456.

Бальон Я. Г. и Шульман М. Д. 1970. Синтез производных ДДД. В сб.: Вопросы эндокринологии и обмена веществ, (1) : 11—14.

Брагинский Л. П. 1972. Пестициды и жизнь водоемов. Изд. «Наукова думка». Киев : 1—227.

Врочинский К. К. 1970. О накоплении пестицидов в гидробионтах. Гидробиологический журн., 6 (4) : 126—128.

Высоцкая Р. У. и Сидоров В. С. 1973. О содержании липидов у некоторых гельминтов пресноводных рыб. Паразитолог., 7 (1) : 51—57.

Головацький І. Д. 1961. Обмін вуглеводів у сІльскогосподарських тварин. Видавництво Укр. акад. с.-г. наук., Київ : 1—273.
Давыдов О. Н. 1972. Метод регистрации двигательной активности паразитических червей. Мед. паразитолог. и паразитарн. болезни, 41 (4) : 421—423.
Комиссаренко В. П., Резникова А. Г. и Гордиенко В. М. 1970. Экспериментальное исследование действия о,п′-ДДД на функцию и структуру коры надпочечных желез. Вопр. эндокринолог. и обмена веществ, (1) : 5—10.
Медведь Л. И., Каган Ю. С., Спыну Е. И. 1968. Пестициды и проблемы здравоохранения. Журн. ВХО им. Менделеева, (3) : 263—271.
Мельников Н. Н. 1968а. Химия пестицидов. Изд. «Химия», М., 86.
Мельников Н. Н. 1968б. Тенденция развития производства и применения пестицидов. Журн. ВХО им. Менделеева, (3) : 248—262.
Мельников Н. Н. 1973. Современные направления развития производства и применения пестицидов. Журн. ВХО им. Менделеева, (5) : 482—494.
Метелев В. В., Канаев А. И. и Дзасохова Н. Г. 1971. Водная токсикология. Изд. «Колос», М. : 1—247.
Меткаф Р., Капур И. и Гирве А. (1972. Аналоги ДДТ, способные к биологическому распаду. Бюллетень ВОЗ (новые инсектициды для борьбы с переносчиками), ч. II, 44, (1—3) : 381—391.
Перевозченко И. И. и Давыдов О. Н. 1974. ДДТ и его метаболиты в тканях некоторых цестод рыб. Гидробиолог. журн., 10 (6) : 86—90.
Chanco P., Talag-Padero J., Coo-Barcelona L., Vidad J. 1972. A new drug for the treatment of ancylostomiasis and necatoriasis: a preliminary report. Asian J. Med., 8 (4) : 152—157.
Cox J. L. 1972. DDT in marine plankton and fish in the California current. Calif. Coop. Ocean. Fish. Invest. Repts, 16 : 107—111.
Morgan R. E., Weinberg R. 1972. Computer simulation on world systems: biogeochemical cycles. Intern. J. Environmental Studies, 3 : 105—118.
Muirhead-Thomson R. C. 1971. Pesticides and freshwater fauna. Academic Press. London—N. Y. : 1—248.
Nichols J. 1961. В кн.: The adrenal cortex, chapter 5. (Под ред. H. D. Moon) : 126—128.

THE STUDY OF CUMULATION, DESORPTION AND MECHANISM OF THE EFFECT OF CHLORORGANIC TOXIC CHEMICALS ON CESTODES OF FISHES

O. N. Davydov, I. I. Perevozchenko, L. P. Braginsky, Ja. G. Baljon

SUMMARY

The distribution of residues of DDT and its metabolites (DDD and DDE) in tissues of *Triaenophorus nodulosus* and its host was studied. It has been noted that cestodes can accumulate chlororganic substances in great quantity. The ability of *Bothriocephalus gowkongensis* has been established to dechlorate pp-DDT and to excrete pp-, op- and mp-DDD from the organism. Pp-DDT decreases the glycogene content and causes the rise of amylolytic activity in the above cestodes in acute tests. The effect of pp-DDT on the locomotor activity of cestodes is of two-phase character. The first one is associated with the muscular influence, the second one — with neurotrophic effect. A high toxicity of mp-DDD (0.1 mg/l) for the locomotor activity of cestodes as compared with the effect of pp-and op-DDD was revealed.